

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-174900

(43)Date of publication of application : 24.06.2003

---

(51)Int.CI. C12Q 1/68  
C12M 1/34  
C12Q 1/32  
C12Q 1/48  
C12Q 1/533

---

(21)Application number : 2001-377229

(71)Applicant : MIYAGI PREFECTURE

(22)Date of filing : 11.12.2001

(72)Inventor : ENDO MISAKO  
MARUYAMA NOBORU

---

**(54) METHOD FOR DETERMINING PYROPHOSPHORIC ACID AND NUCLEIC ACID AND APPARATUS THEREFOR**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for highly accurately detecting and determining pyrophosphoric acid, to provide a method for detecting and determining nucleic acid by various nucleic acid proliferation methods utilizing the method for detecting and determining the pyrophosphoric acid, and to provide an apparatus useful for the method.

**SOLUTION:** This method for accurately detecting and determining the pyrophosphoric acid is characterized by comprising a process for adding inosinic acid and/or xanthyllic acid and a tetrazolium salt to a solution containing pyrophosphoric acid, a process for treating the pyrophosphoric acid with hypoxanthine phosphoribosyltransferase and dehydrogenase/oxidase to obtain the formazan, and a process for detecting and determining the produced formazan.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 29.03.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

This Page Blank (uspto)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-174900

(P2003-174900A)

(43) 公開日 平成15年6月24日 (2003.6.24)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 12 Q 1/68  
C 12 M 1/34  
C 12 Q 1/32  
1/48  
1/533

識別記号

F I  
C 12 Q 1/68  
C 12 M 1/34  
C 12 Q 1/32  
1/48  
1/533

テマコード(参考)  
A 4 B 0 2 9  
E 4 B 0 6 3  
Z

審査請求 未請求 請求項の数19 O.L. (全11頁)

(21) 出願番号 特願2001-377229 (P2001-377229)

(22) 出願日 平成13年12月11日 (2001.12.11)

(71) 出願人 591074736

宮城県  
宮城県仙台市青葉区本町3丁目8番1号

(72) 発明者 遠藤 美砂子

宮城県仙台市泉区明通2丁目2番地 宮城  
県産業技術総合センター内

(72) 発明者 丸山 昇

宮城県仙台市泉区明通2丁目2番地 宮城  
県産業技術総合センター内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピロリン酸と核酸の定量方法およびその装置

(57) 【要約】

【課題】 高精度なピロリン酸の検知・定量方法を提供すること、また、該ピロリン酸の検知・定量方法を利用した各種核酸增幅法による核酸の検知・定量方法及び該方法に有用な装置を提供すること。

【解決手段】 ピロリン酸を含む溶液に、イノシン酸および/またはキサンチル酸およびテトラゾリウム塩を添加する工程と、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを作用させピロリン酸をホルマザンに変換する工程と、生成するホルマザンを検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロリン酸を含む溶液に、イノシン酸および/またはキサンチル酸およびテトラゾリウム塩を添加する工程と、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを作用させピロリン酸をホルマザンに変換する工程と、生成するホルマザンを検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【請求項2】 ピロリン酸を含む溶液に、イノシン酸および/またはキサンチル酸を添加する工程と、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを作用させピロリン酸を過酸化水素またはスーパーオキシドに変換する工程と、生成する過酸化水素またはスーパーオキシドを検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【請求項3】 ピロリン酸を含む溶液に、オキサロ酸を添加する工程と、ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ(ピロリン酸)を作用させピロリン酸を二酸化炭素に変換する工程と、生成する二酸化炭素を検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【請求項4】 ピロリン酸を含む試料溶液に、D-フェニルアラニンとアデノシン三リン酸を添加する工程と、フェニルアラニンラセマーゼを作用させピロリン酸をL-フェニルアラニンに変換する工程と、生成するL-フェニルアラニンを検知・定量する工程とを含むことを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【請求項5】 ピロリン酸を含む試料溶液に、アデニル硫酸を添加する工程と、アデノシン三リン酸スルフリラーゼを作用させピロリン酸を硫酸イオンに変換する工程と、生成する硫酸イオンを検知・定量する工程とを含むことを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【請求項6】 核酸の検知・定量方法であって、試料溶液中の核酸を増幅する工程と、前記増幅後の試料溶液に含有されるピロリン酸を請求項1～5のいずれか1項に記載の方法を用いて検知・定量する工程と、を含むことを特徴とする、核酸の検知・定量方法。

【請求項7】 核酸の検知・定量方法であって、核酸を含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする加熱変性の第1の工程と、前記第1の工程で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりブライミング核酸を生成させる第2の工程と、前記第2の工程で生成したブライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の伸長反応の工程と、前記第3の工程で遊離したピロリン酸

を、請求項1ないし5のいずれか1項記載の方法を用いて検知・定量する第4の工程とを具備する、核酸の検知・定量方法。

【請求項8】 前記第3の工程における伸長反応がDNAポリメラーゼを固定化した反応器中で行われ、前記第4の工程におけるピロリン酸の変換が酵素を固定化した反応器中で行われることを特徴とする、請求項7に記載の核酸の検知・定量方法。

【請求項9】 核酸とアデニル硫酸とルシフェリンを含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする加熱変性の第1の工程と、前記第1の工程で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりブライミング核酸を生成させる第2の工程と、前記第2の工程で生成したブライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の伸長反応の工程と、前記第3の工程で遊離したピロリン酸に、酵素であるアデノシン三リン酸スルフリラーゼおよびルシフェラーゼを作用させ生成する物質として光を検知・定量する第4の工程とを具備する核酸の検知・定量方法であって、前記第3の工程における伸長反応がDNAポリメラーゼを固定化した反応器中で行われ、前記第4の工程におけるピロリン酸の変換が前記酵素を固定化した反応器中で行われることを特徴とする、核酸の検知・定量方法。

【請求項10】 試料溶液が環流することにより、前記第1、第2、第3及び第4の工程が順次複数回循環して行われることを特徴とする、請求項7～9のいずれか1項記載の核酸の検知・定量方法。

【請求項11】 核酸を含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする第1の処理部と、前記第1の処理部で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりブライミング核酸を生成させる第2の処理部と、前記第2の処理部で得られたブライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の処理部と、前記第3の処理部で遊離したピロリン酸に請求項1ないし5のいずれか1項記載の酵素を作用させ、該ピロリン酸を変換する第4の処理部と、前記第4の処理部で得られた生成物を検知・定量する第5の処理部とを備えた、核酸を検知・定量するための装置。

【請求項12】 前記第3の処理部がDNAポリメラーゼを固定化した反応器を備え、前記第4の処理部が前記酵素を固定化した反応器を備えることを特徴とする、請求項11に記載の核酸を検知・定量するための装置。

【請求項13】 試料溶液が前記第1ないし第5の処理部を順次複数回循環するための流路を有することを特徴とする、請求項11又は12に記載の核酸を検知・定量するための装置。

【請求項14】 請求項1に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とイノシン酸および/またはキサンチル酸とテトラゾリウム塩とヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼとキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼとを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【請求項15】 請求項2に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とイノシン酸および/またはキサンチル酸とヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼとキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼと生成する過酸化水素またはスーパーオキシドを検知する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【請求項16】 請求項3に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とオキサロ酢酸とホスホエノールビルピン酸カルボキシキナーゼと生成する二酸化炭素を検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【請求項17】 請求項4に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とD-フェニルアラニンとアデノシンニリン酸とフェニルアラニンラセマーゼと生成するL-フェニルアラニンを検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【請求項18】 請求項5に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とアデニリル硫酸とアデノシン三リン酸スルフリラーゼと生成する硫酸イオンを検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含む試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【請求項19】 標的とする核酸の検知・定量に有用な試薬キットであって、請求項7ないし11のいずれか1項記載の試薬キットに加え、更に核酸を増幅するため必要な試薬を含む試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はピロリン酸の検知・定量方法に関するものである。本発明はまた、該ピロリン酸の検知・定量方法を利用した核酸の検知・定量方法であって、詳しくはポリメラーゼ連鎖反応を含む種々の増幅方法を用いて特定核酸領域を増幅したときに生成するピロリン酸を検知・定量することにより核酸を検知・

定量する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査または食中毒検査等の分野においては、組織、体液、便等の微量の微生物核酸を検出・定量する必要がある。また、各種研究分野では、各種疾病、医薬品等の作用で発現する特定のメッセンジャーRNA発現量を定量することが求められている。

【0003】 迅速に病原体等の同定を行う方法としては、抗原抗体反応を利用した抗原検出方法又はDNAプローブによる核酸の検出方法も行われている。

【0004】 しかしながら、抗原抗体反応を利用した抗原検出においては、病原体の抗原部分が隠蔽されているような場合には、病原体を検出できないおそれがある。また、細菌等においては非常に多くの抗原部分を有する場合があり、特定の細菌種に固有な特定共通抗原部分を見い出すことは必ずしも容易ではない。また、検出にはある程度の数又は濃度の細菌または細胞が必要であり、細胞数等が不足することにより、病原体を検出できない場合があり、感度的にも問題がある。

【0005】 これに対し、DNAプローブによる核酸検出方法においては、生物種固有の核酸領域を見出すことは比較的容易で、この核酸領域をクローニングし又は合成することにより、核酸プローブとして用いることができるといった利点がある。しかし、DNAプローブ法についても、鑄型となる核酸量が少ない場合は、十分な検出感度は得られない。

【0006】 また、特定塩基配列をDNAポリメラーゼにより増幅させる方法を利用した核酸の検出法（ポリメラーゼチェーンリアクション法、PCR法）が有効な手段として汎用されている。このPCR法は、核酸分子中の特定核酸領域を試験管内で100万倍にも増幅するものである。このPCRを利用することにより標的核酸の特定核酸領域を増幅された状態で検出することが可能となり、感度的には1分子の核酸から病原体を検出することも可能となっている。PCRについての詳細な説明は、例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,965,188号明細書に記載されている。

【0007】 そして、この増幅された特定核酸領域の一般的な検出方法として、PCR終了後の反応溶液をアガロース電気泳動により、分離した後染色し、バンドの大きさ（分子量）で判別する方法や、前記反応溶液をドットハイブリダイゼーション法により検出する方法が行われている。この検出方法は、細菌中のDNAを直接増幅して検出できるため、検査時間が短くかつ細菌の同定が容易であるという特徴を有する。しかし複雑でかつ時間のかかる電気泳動工程は、現場での利用については不便な点が多い。

【0008】 電気泳動を行うことなく、PCR生成物を

検出および定量する方法として、PCR開始前の反応液に予め、DNAとインターラートしたときのみ蛍光を発する試薬を添加し、蛍光分光光度計を使用して蛍光強度を測定することにより、増幅DNA量を測定する方法（特開平5-237000号公報）を挙げることができる。標的核酸の初期錆型量は、インターラート性蛍光色素の存在下でPCRを行い、反応液の蛍光を各PCRサイクル毎に測定してその変化から求めることができる。しかしこのような目的のために設計された蛍光強度を各サイクル毎に測定するための装置は高価であるという欠点を有する。またDNAとインターラートする試薬は生体にとって有害である。

【0009】DNAとのインターラート試薬を用いない方法としては、（1）WO 92/16654もしくはJ. Immunol. Methods 156, 55 (1992)には、PCRによる核酸増幅過程で生成する副生成物のピロリン酸を、アデノシン三リン酸スルフリラーゼの作用でアデノシン三リン酸に導き、アデノシン三リン酸をさらにルシフェリールシフェラーゼ法で発光させ、検出することによりピロリン酸を検出する方法が用いられている。

【0010】また、（2）特開平7-596007号公報には、ピロリン酸を無機ピロフォスファターゼなどを用いて分解した生成物であるリン酸を検出することにより、標的とする遺伝子核酸を検出する方法が記載されている。

【0011】現状のPCR反応装置（PCR反応と同時に蛍光強度の測定を行う手段を備えた装置を含む）は、熱安定性酵素およびプライマー、その他PCR反応に必要な全ての試薬を予め密閉容器に分注し、核酸2本鎖の解離、1本鎖核酸とプライマーのアニーリング及び核酸ポリメラーゼによる相補鎖合成の3反応の繰返しを行うための、温度-循環装置である。この装置を用いることにより、他の検体の核酸に汚染されることなく、試料の標的錆型DNAは短時間で増幅される。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】従来のピロリン酸の測定方法（1）は、高価な化学発光検出器を必要とし、かつ生成した発光は不安定で、瞬時に発光を失うという欠点を有する。そのため、各種核酸増幅法により生成するピロリン酸増幅量をリアルタイムに測定するには不便である。さらにピロリン酸をアデノシン三リン酸に誘導して検出するため、生体内に存在するアデノシン三リン酸がバックグラウンドとして検出される可能性が高い。またピロリン酸の測定方法（2）では、ピロリン酸の分解生成物であるリン酸の定量は公知の方法では検出感度が低く、モリブデン酸塩などの重金属イオン廃液の処理を伴うなどの欠点を有する。さらに生体、食品、培地などに多く利用させるリン酸塩がバックグラウンドとして検出されるため、実用には適さない。

【0013】また、従来の温度-循環装置によるPCR反

応では、RNAや1本鎖DNAを錆型として用いた場合には、非特異的増幅反応を起こしやすく、かつ耐熱性酵素といえども熱による失活を回避することは出来ない。また増幅の結果生成するピロリン酸が、増幅反応を阻害することが知られている。

【0014】本発明は以上のような問題点に鑑み創案されたものであり、高精度なピロリン酸の検知・定量方法を提供すること、また、該ピロリン酸の検知・定量方法を利用した各種核酸増幅法による核酸の検知・定量方法及び該方法に有用な装置を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、特定の酵素を用いてピロリン酸を公知の方法で高感度に検出可能な物質に変換し、これを検知・定量することにより、安定且つ高精度にピロリン酸を検知・定量し得、更に該ピロリン酸の検知・定量方法が各種核酸増幅法による核酸の検知・定量に極めて有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。更に本発明者等は、特定酵素を用いて試料-環流方式を用いた装置を使用することにより、温度-循環装置を用いてPCR反応を行った場合の上記欠点が解決されることをも見出し本発明を完成するに至った。

【0016】すなわち、本発明は下記構成を有する。

（1）ピロリン酸を含む溶液に、イノシン酸および/またはキサンチル酸およびテトラゾリウム塩を添加する工程と、ヒポキサンチンホスホリボシリルトランスフェラーゼおよびキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを作用させピロリン酸をホルマザンに変換する工程と、生成するホルマザンを検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【0017】（2）ピロリン酸を含む溶液に、イノシン酸および/またはキサンチル酸を添加する工程と、ヒポキサンチンホスホリボシリルトランスフェラーゼおよびキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを作用させピロリン酸を過酸化水素またはスーパーオキシドに変換する工程と、生成する過酸化水素またはスーパーオキシドを検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【0018】（3）ピロリン酸を含む溶液に、オキサロ酸を添加する工程と、ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ（ピロリン酸）を作用させピロリン酸を二酸化炭素に変換する工程と、生成する二酸化炭素を検知・定量する工程とを具備することを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【0019】（4）ピロリン酸を含む試料溶液に、D-フェニルアラニンとアデノシン三リン酸を添加する工程と、フェニルアラニンラセマーゼを作用させピロリン酸をL-フェニルアラニンに変換する工程と、生成するL-フェニルアラニンを検知・定量する工程とを含むことを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【0020】(5) ピロリン酸を含む試料溶液に、アデニル硫酸を添加する工程と、アデノシン三リン酸スルフリラーゼを作用させピロリン酸を硫酸イオンに変換する工程と、生成する硫酸イオンを検知・定量する工程とを含むことを特徴とする、ピロリン酸の検知・定量方法。

【0021】(6) 核酸の検知・定量方法であって、試料溶液中の核酸を増幅する工程と、前記増幅後の試料溶液に含有されるピロリン酸を(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法を用いて検知・定量する工程と、を含むことを特徴とする、核酸の検知・定量方法。

【0022】(7) 核酸の検知・定量方法であって、核酸を含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする加熱変性の第1の工程と、前記第1の工程で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりプライミング核酸を生成させる第2の工程と、前記第2の工程で生成したプライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の伸長反応の工程と、前記第3の工程で遊離したピロリン酸を、(1)ないし(5)のいずれか1項記載の方法を用いて検知・定量する第4の工程とを具備する、核酸の検知・定量方法。

【0023】(8) 前記第3の工程における伸長反応がDNAポリメラーゼを固定化した反応器中で行われ、前記第4の工程におけるピロリン酸の変換が酵素を固定化した反応器中で行われることを特徴とする、(7)に記載の核酸の検知・定量方法。

【0024】(9) 核酸とアデニル硫酸とルシフェリンを含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする加熱変性の第1の工程と、前記第1の工程で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりプライミング核酸を生成させる第2の工程と、前記第2の工程で生成したプライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の伸長反応の工程と、前記第3の工程で遊離したピロリン酸に、酵素であるアデノシン三リン酸スルフリラーゼおよびルシフェラーゼを作用させ生成する物質として光を検知・定量する第4の工程とを具備する核酸の検知・定量方法であって、前記第3の工程における伸長反応がDNAポリメラーゼを固定化した反応器中で行われ、前記第4の工程におけるピロリン酸の変換が前記酵素を固定化した反応器中で行われることを特徴とする、核酸の検知・定量方法。

【0025】(10) 試料溶液が環流することによ

り、前記第1、第2、第3及び第4の工程が順次複数回循環して行われることを特徴とする、(7)～(9)のいずれか1項記載の核酸の検知・定量方法。

【0026】(11) 核酸を含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする第1の処理部と、前記第1の処理部で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりプライミング核酸を生成させる第2の処理部と、前記第2の処理部で得られたプライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ピロリン酸を遊離させる第3の処理部と、前記第3の処理部で遊離したピロリン酸に(1)ないし(5)のいずれか1項記載の酵素を作用させ、該ピロリン酸を変換する第4の処理部と、前記第4の処理部で得られた生成物を検知・定量する第5の処理部とを備えた、核酸を検知・定量するための装置。

【0027】(12) 前記第3の処理部がDNAポリメラーゼを固定化した反応器を備え、前記第4の処理部が前記酵素を固定化した反応器を備えることを特徴とする、(11)に記載の核酸を検知・定量するための装置。

【0028】(13) 試料溶液が前記第1ないし第5の処理部を順次複数回循環するための流路を有することを特徴とする、(11)又は(12)に記載の核酸を検知・定量するための装置。

【0029】(14) (1)に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とイノシン酸および/またはキサンチル酸とテトラゾリウム塩とヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼとキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼとを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【0030】(15) (2)に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とイノシン酸および/またはキサンチル酸とヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼとキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼと生成する過酸化水素またはスーパーオキシドを検知する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【0031】(16) (3)に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とオキサロ酢酸とホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼと生成する二酸化炭素を検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【0032】(17) (4)に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸

とD-フェニルアラニンとアデノシン二リン酸とフェニルアラニンラセマーゼと生成するL-フェニルアラニンを検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含有する試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

【0033】(18) (5)に記載のピロリン酸の検出・定量方法に有用な試薬キットであって、ピロリン酸とアデニリル硫酸とアデノシン三リン酸スルフリラーゼと生成する硫酸イオンを検知あるいは定量する試薬とを、各々単独で含む試薬として、またはいずれか2種以上の混合試薬として含む試薬キット。

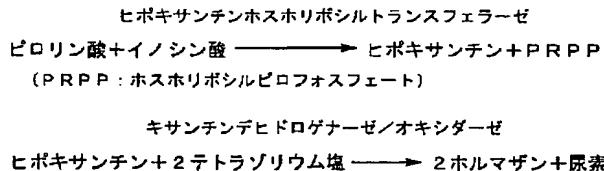
【0034】(19) 標的とする核酸の検知・定量に有用な試薬キットであって、(7)～(11)のいずれか1項記載の試薬キットに加え、更に核酸を增幅するために必要な試薬を含む試薬キット。

【0035】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

【0036】本発明により提供されるピロリン酸の検知・定量方法は、本発明者らが、各種核酸増幅手法で生成するピロリン酸の測定方法を開発する一環として開発されたものである。従って、PCR法、Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids法 (ICAN法)、Loop-mediated isothermal amplification法 (LAMP法)などの各種手法を用いて増幅される核酸量の変化を、ピロリン酸量から推定しようする場合のピロリン酸の測定方法として好適である。但し、本発明のピロリン酸測定方法は、核酸増幅法により生成するピロリン酸の検知・定量方法としてのみならず、食品添加物として食品に添加される各種ピロリン酸塩の測定方法としても有効である。

【0037】その他に本発明の方法を利用して測定できる物質として、イノシン酸、アデノシン二リン酸、オキサロ酢酸、D-フェニルアラニン、アデニリル硫酸などを\*



【0041】各試薬および酵素の添加順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいし、これらを混合物として添加してもよい。

【0042】本方法に用いるテトラゾリウム塩は特に制限されるものではなく、例えばバラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット、チアゾイルブルー、ネオテトラゾリウムクロライド、ニトロブルーテトラゾリウム、テトラニトロブルーテトラゾリウム、テトラゾリウムブルー、テトラゾリウムレッド、テトラゾリウムバイオレット、チオカルバモイルニトロブルーテトラゾリウム、ト

10 \*挙げることができる。

【0038】上述したように、ピロリン酸測定方法としては従来、ピロリン酸にアデノシン三リン酸スルフリラーゼを作用させた後、ルシフェリンールシフェラーゼ法を利用して、生成する発光を検出する方法や、ピロリン酸を無機ピロフォスファターゼなどを用いて分解した生成物であるリン酸を検出する方法が用いられている。本発明では、以下に詳述するように特定の酵素と試薬を組み合わせることで、ピロリン酸を安定且つ高精度に検知および定量できることを新たに見出したものである。

【0039】本発明により新規に提供されるピロリン酸を測定するための第1の方法は、ピロリン酸を含む測定試料に必要量のイノシン酸またはキサンチル酸と、テトラゾリウム塩とを添加し、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (EC 2.4.2.8) およびキサンチンデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.204) / オキシダーゼ (EC 1.1.3.22) を作用させ、生成するホルマザンを測定するものである。本測定方法は、過剰のイノシン酸またはキサンチル酸と過剰のテトラゾリウム塩の存在下で酵素反応を行うとほぼ定量的に、イノシン酸を用いた場合はピロリン酸1モルから2モルのホルマザンが生成し、キサンチル酸を用いた場合はピロリン酸1モルから1モルのホルマザンが生成することを利用し開発されたものであり、定量が容易なホルマザンを公知の方法で定量することにより、ピロリン酸を高精度で定量することが可能となる。ホルマザンの測定方法の具体例としては、ホルマザンは呈色することから、分光光度計で吸光度を測定することにより定量することができる。本測定方法では、イノシン酸とキサンチル酸双方を同時に用いることもできる。イノシン酸を用いた場合の上記反応は以下のような反応式で示される。

【0040】

【化1】

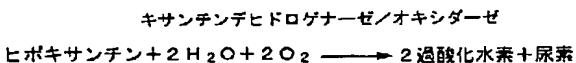
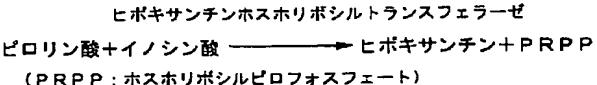
リフェニルテトラゾリウムクロライド等を挙げることができる。

【0043】例えば、バラヨードニトロテトラゾリウムバイオレットを用いて、ピロリン酸を測定する場合には、通常は0.1～100mM程度のイノシン酸、0.1～100mM程度のバラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット、1～1000mM程度の塩化カリウム、1～1000mM程度の塩化マグネシウム、50～5000 unit/L程度のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、5～500 unit/L程度のキサンチンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼを含む

～500mM程度のトリス塩酸緩衝液（好ましくはpH 6.5～8.0程度）を用いて、25～37°Cで10～120分反応させた後、生成するホルマザンを547nm程度の波長で比色定量すればよい。

【0044】第2の方法は、ピロリン酸を含む測定試料に必要量のイノシン酸またはキサンチル酸を添加し、ヒポキサンチンホスホリボシリルトランスフェラーゼ（EC 2.4.2.8）およびキサンチンデヒドロゲナーゼ（EC 1.1.1.204）／オキシダーゼ（EC 1.1.3.22）を作用させ、生成する過酸化水素またはスーパーオキシドを測定するものである。

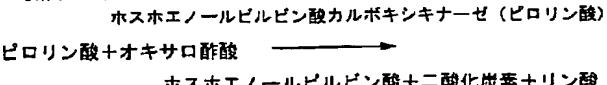
【0045】本測定方法では、イノシン酸とキサンチル酸双方を同時に用いることもできる。イノシン酸および\*



【0047】各試薬および酵素の添加順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいし、これらを混合物として添加してもよい。

【0048】第2の方法を用いてピロリン酸を測定する場合には、通常は0.1～100mM程度のイノシン酸、0.1～100mM程度の酸素、1～1000mM程度の塩化カリウム、1～1000mM程度の塩化マグネシウム、50～5000 unit/L程度のヒポキサンチンホスホリボシリルトランスフェラーゼ、5～500 unit/L程度のキサンチンデヒドロゲナーゼ／オキシダーゼを含む5～500mM程度のトリス塩酸緩衝液（好ましくはpH 6.5～8.0程度）を用いて、25～37°Cで10～120分反応させ、生成する過酸化水素を公知の方法で測定することにより、相関的にピロリン酸を定量することができる。

【0049】この方法は、従来のピロリン酸測定方法では満足のいく検出感度が得られなかったことから、従来法で検出感度の高い過酸化水素に誘導して検出することによりピロリン酸の検出感度を上昇させることを目的として開発されたものである。過酸化水素に誘導することの利点は検出感度が高く、かつ測定が紫外可視分光光度※



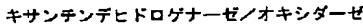
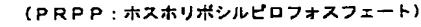
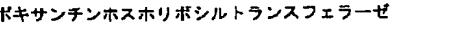
【0053】上記試薬および酵素の添加順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいし、これらを混合物として添加してもよい。

【0054】ピロリン酸を測定しようとする場合には、例えば0.1～1000mM程度のオキサロ酢酸、1～1000mM程度の塩化マグネシウム、0.01～5 unit/mL程度のホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ（ピロリン酸）を

\* キサンチル酸のいずれを基質として用いた場合においても、スーパーオキシド（O<sub>2</sub>）が一旦生成するが、適当な化学発光物質（例えばルミノールなど）と共存させることにより、生成したスーパーオキシドを過酸化水素ではなく、直接発光種に導くことができるため、化学発光強度を測定することにより、ピロリン酸量を測定することができる。一方、化学発光試薬を用いない場合にはスーパーオキシドはすみやかに過酸化水素に変換する。その場合の反応は以下の反応式で表すことができ、測定される過酸化水素量とピロリン酸量は下記反応式で示されるように、相関性があり、ピロリン酸量が測定できる。

【0046】

【化2】



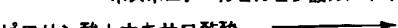
20※計などの安価で汎用性の高い装置もしくは、化学発光検出器や蛍光検出器などの高感度装置のいずれでも測定できること、過酸化水素が溶液中で安定なことが挙げられる。

【0050】過酸化水素の検出に関しては、試薬を用いての検出方法など数多くの従来法を用いて検出できる。その最も簡単な態様として、本測定方法では過酸化水素との1回以上の反応に応じて色シグナルを提供する試薬を用いて過酸化水素を検出する方法を用いることができる。このような方法のうちの一つは、還元型バテントブルーおよびペルオキシダーゼの存在下で、生成する青色の呈色を640nmの波長で評価するものである。

【0051】第3の方法は、ピロリン酸を含む測定試料に、必要量のオキサロ酢酸を添加し、ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ（ピロリン酸）（EC 4.1.1.38）を作用させ、生成する二酸化炭素を測定する方法である。該反応は以下の反応式で示される。

【0052】

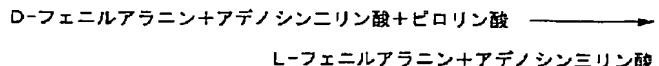
【化3】



含む5～500mM程度のトリス塩酸緩衝液（好ましくはpH 6.5～9.0程度）を用いて、25～37°Cで10～120分反応させればよい。生成する二酸化炭素の生成量を測定することにより、ピロリン酸を測定することができる。二酸化炭素の測定方法としては、公知の方法を用いることができる。

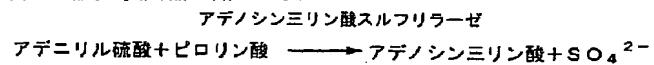
【0055】第4の方法は、ピロリン酸を含む測定試料

にフェニルアラニンラセマーゼ (EC5.1.1.11) を作用させる方法である。ピロリン酸を含む測定試料に、D-フェニルアラニン、アデノシン二リン酸を添加し、フェニルアラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.11) を作用させ、生成 \*



【0057】各試薬および酵素の添加順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいし、これらを混合物として添加してもよい。

【0058】基質としてD-フェニルアラニン、アデノシン二リン酸、酵素としてフェニルアラニンラセマーゼが必要であり、通常は0.1～1000mM程度のD-フェニルアラニン、0.1～1000mM程度のアデノシン二リン酸、0.01～5 unit/mM程度のフェニルアラニンラセマーゼを含む5～500mM程度のトリス塩酸緩衝液 (pH 6.5～8.0程度) を用いて、25～37°Cで10～120分反応させればよい。生成するL-フェニルアラニンの生成量は旋光検出器を用いて測定する。



【0061】各試薬および酵素の添加順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいし、これらを混合物として添加してもよい。

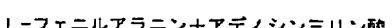
【0062】ピロリン酸を測定しようとする場合には、通常は0.1～1000mM程度のアデニル硫酸、0.1～100mM程度のエチレンジアミンテトラ酢酸、0.01～1%程度の牛血清アルブミン、1～100mM程度の酢酸マグネシウム、0.001～1mM程度のジチオトレイトル、0.01～5 unit/mM程度のアデノシン二リン酸スルフリラーゼを含む5～500mM程度のトリス酢酸緩衝液 (pH 6.5～8.0程度) を用いて、25～37°Cで1～50分反応させ、生成する硫酸イオンを公知の方法を用いて測定することにより、ピロリン酸を定量することができる。例えば、生成する硫酸イオンを塩酸酸性下で塩酸バリウムを加えて反応させ、生成した硫酸バリウムの濁りを比濁計を用いて測定することにより、ピロリン酸を測定することができる。

【0063】本発明のピロリン酸測定方法において用いられる試薬及び酵素は、試薬キットの構成品として供給されることが有利である。このような試薬キットの構成品は、所定の方法等に応じて適切な濃度で提供され、予め蓋付き容器に分注されていることが望ましい。本発明により提供される試薬キットに含まれる構成品は、測定試料及び測定方法等に応じて必要とされる試薬及び酵素各々を単独で含有するもの、あるいは2種以上の試薬又は酵素の混合物である。これら構成品たる試薬及び酵素は、必要な安全性及び取り扱いの簡便さの観点から適宜包装（乾式又は湿式）され得る。本試薬キットを用いて、ピロリン酸を検知する手段としては、紫外可視分光光度計、蛍光分光光度計、化学発光検出器などの高度な

\*するL-フェニルアラニンを測定する。該反応は以下の反応式で示される。

【0056】

【化4】



※定することにより、ピロリン酸を測定することができる。

10

【0059】第5の方法は、ピロリン酸を含む測定試料にアデノシン二リン酸スルフリラーゼ (EC 2.7.7.4) を作用させる方法である。ピロリン酸を含む測定試料に基質としてアデニル硫酸を添加し、アデノシン二リン酸スルフリラーゼ (EC 2.7.7.4) を作用させ、生成する硫酸イオンを測定する。

【0060】

【化5】

光学機器を用いた精密定量の他に、ピロリン酸の有無を確認するための簡易判定として、肉眼による色見本との濃淡比較もしくは写真やCCDカメラ等による呈色または蛍光、発光の濃淡によっておおよその濃度を知ることも可能である。パソコンによる色データの時間変化などにより、おおよその濃度とその時間変化から、菌の定量にも利用できる。

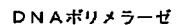
【0064】本発明のピロリン酸の検知・定量方法は各種核酸增幅法による核酸の検知・定量に極めて有用である。すなわち、PCRは勿論、LAMP法、ICAN法など核酸増幅に伴いピロリン酸が同時に生成される場合に、本発明のピロリン酸の検知・定量方法を利用することにより、有害な試薬を用いることなく、高感度且つ簡便に核酸を検知・定量することが実用的なものとなつた。

【0065】以下、核酸増幅法としてPCR法を用いた場合に本発明のピロリン酸の検知・定量方法を利用した核酸の検知・定量方法について詳しく説明する。

40 【0066】PCR反応は以下の様に反応しピロリン酸を副生成物として遊離する。従って、ピロリン酸 (PP<sub>i</sub>) 生成量は増幅DNA量に比例する。

【0067】

【化6】



(n=DNA塩基数)

【0068】本発明によりウイルス等の初期錆型核酸量を定量する場合は、PCRによって指數関数的にピロリン酸が生成することを利用する。PCR反応生成物は、

反応初期にはほぼ指数関数的増加を示し、十分なサイクル数PCRを行った場合は、初期錆型核酸量に関係なくほぼ同じ量のPCR反応生成物が得られる。従ってPCR反応生成物がある一定量に達するサイクル数(CT)は初期錆型核酸量と逆相関の関係にある。またこの関係が成り立つためには初期錆型核酸量が異なっていても指数増幅期の増幅率が等しくなければならない。標的配列と同じ場合はこの関係が成立しているため、CTから初期錆型核酸量を推定することが可能である。本発明ではサイクル数を変化させてPCR反応を行い、各サイクル数におけるビロリン酸の生成量から初期錆型核酸量を定量する方法を用いる。

【0069】初期錆型核酸量の定量には、同一サンプルにおいて例えば1~40サイクルの範囲でサイクル数を変化させてPCR反応を行い、各サンプルの遊離ビロリン酸量を検出する工程が含まれるため、好ましくは連続的な自動化された方法で行われる。

【0070】従って、本発明による核酸の検知・定量方法は、核酸を含有する試料溶液を加熱して核酸を一本鎖にする加熱変性の第1の工程と、前記第1の工程で得られた一本鎖核酸に、少なくとも1つの特定塩基配列に対し相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせることによりプライミング核酸を生成させる第2の工程と、前記第2の工程で生成したプライミング核酸に4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とDNAポリメラーゼを作用させ、伸長反応させてDNA相補鎖を合成するとともに、ビロリン酸を遊離させる第3の伸長反応の工程と、前記第3の工程で遊離したビロリン酸を、上記5つの核酸の検知・定量方法のうちいずれか1つの方法を用いて検知・定量する第4の工程とを具備し、試料溶液が環流することにより、前記第1、第2、第3及び第4の工程が順次複数回循環して行われるようになっている(以下、「試料-環流方式」とも言う。)ことが好ましい。

【0071】さらに、本発明による核酸の検知・定量方法は、前記第3の工程における伸長反応がDNAポリメラーゼを固定化した反応器中で行われ、前記第4の工程におけるビロリン酸の変換が酵素を固定化した反応器中で行われることが好ましく、かかる本発明による核酸の検知・定量方法を用いれば、従来法であるルシフェリン・ルシフェラーゼ法の原理を用いて有効に核酸を検知・定量することが可能になることもまた、本発明者等により見出された。

【0072】すなわち、上述した本発明による核酸の検知・定量方法において、ビロリン酸を含む溶液に、ビロリン酸を定量するための試薬としてアデニル硫酸およびルシフェリンを添加した溶液を試料溶液として用い、前記第4の工程においてビロリン酸の変換が行われる反応器に固定化される酵素としてアデノシン三リン酸スルフリラーゼおよびルシフェラーゼを用いる。そして、酵

素の作用によりビロリン酸が変換され、生成する物質として光を検知・定量する。本発明の試料-環流方式によれば瞬時の光の検出が可能となり、核酸を検知・定量することができる。

【0073】本発明のビロリン酸の検知・定量方法を用いての初期錆型核酸量の測定は、核酸増幅法としてPCR法を用いた場合を例にとれば従来のPCR反応用の装置である温度-循環方式を用いて実施することができるが、特に上記試料-環流方式による初期錆型核酸量の測定は、以下に詳述する本発明の試料-環流方式による装置(以下、「試料-環流装置」とも言う。)にて実施することができる。

【0074】すなわち、核酸増幅法としてPCR反応を利用した場合の本発明の試料-環流方式による測定を行うために必要な試料-環流装置のうち、好ましい態様では、ガラスやプラスチック基盤上に、PCR反応に必要な温度変化や酵素反応などを促す回路を微細加工し、溝に垂らした試料溶液を電気的に移動させながら、PCR反応を順次行わせる構成となっている。より詳細には、20 本発明により提供される装置は、加熱変性を行う第1の処理部と、アニーリングを行う第2の処理部と、DNA伸長反応を行いビロリン酸を遊離させる第3の処理部と、前記第3の処理部で遊離したビロリン酸に特定の酵素を作用させ、該ビロリン酸を他の物質に変換する第4の処理部と、前記第4の処理部で得られた生成物を検知・定量する第5の処理部とを備え、試料溶液が前記第1ないし第5の処理部を順次複数回循環するための流路を有し、例えば電気的作用により試料溶液が前記流路を前記第1ないし第5の順に複数回循環する構成となっている。

【0075】更に好ましくは、前記第3の処理部がDNAポリメラーゼを固定化した反応器を備え、前記第4の処理部が前記酵素を固定化した反応器を備える。

【0076】本発明の試料-環流装置を用いることにより、核酸の非特異的増幅を抑制することができ、かつ反応副生成物であるビロリン酸の蓄積や酵素の失活を抑制することができる。

【0077】また、本発明のビロリン酸測定方法を用いて、核酸の有無の検出または定量を行おうとする場合に用いられる試薬及び酵素は、試薬キットの構成品として供給されることが有利である。このような試薬キットの構成品としては、上記ビロリン酸の検知・定量法において用いられる試薬に加え、更に核酸を増幅するために必要な試薬を含む。核酸を増幅するために必要な試薬としては、プライマー類、コファクター類、ヌクレオチド-3-リン酸類等を挙げることができ、所定の方法等に応じて適切な濃度で提供される。核酸増幅に使用される試薬の最低量、および各々の適当な範囲は当該技術分野で周知である。

【0078】本発明によれば、色素生成による判定で

は、特別に検出装置を使わず、特定の核酸の存在の有無が目視で簡易に判定することも可能である。

【0079】

【実施例】次に本発明を実施例により更に詳細に説明するが、実施例は例示のために提示するものであって、どのようにも本発明を限定することを意図するものではない。

【0080】【実施例1】1mMイノシン酸、1mMバラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット、100mM塩化カリウム、10mM塩化マグネシウム、50 unit/Lヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、50 units/Lキサンチンデヒドロゲナーゼ／オキシダーゼを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.4) 1 mlに既知濃度のピロリン酸溶液5 μlを加え、37°Cで10分反応させた後、546 nmで比色定量した。そのときのピロリン酸の検量線を図1に示す。本実施例の結果から、本発明の方法を用いて精度よくピロリン酸を測定できることがわかる。

【0081】【実施例2】アマシャムファルマシアバイオテク(株)のReady-To-Go PCR Breadsを用いて、PCR法による核酸の増幅を行った。PCRを行う反応溶液はキット添付のControl Lambda DNA および1組のプライマーを用いて、キット添付のプロトコールに従って調製した。そして、変性(95°C、1分)、アニーリング(55°C、1分)、DNA伸長反応(72°C、1分)のサイクルを、5、10、15、20、24、26、28、30サイクル行った。反応溶液の組成は以下のとおりである。

【0082】

反応溶液の組成(PCR Breads 1 ピース中)

Control Lambda DNA	1 μl
Control Primer 1	1 μl
Control Primer 2	1 μl
滅菌蒸留水	22 μl

PCR終了後、5 μlの反応溶液に対して、実施例1と同様の方法を用いて、546 nmで比色定量した。そのときの吸光度とサイクル数の関係を図2に示す。

【0083】本実施例の結果から、本発明の方法を用いてピロリン酸を測定することにより、PCR反応の過程で指數関数的に生成するピロリン酸を精度よくモニターすることができた。従って、本発明は初期錆型核酸量の定量に有効であることが示された。

【0084】【実施例3】図3に本発明の核酸定量装置の一態様を示す。標準的な濃度のイノシン酸、テトラゾリウム塩、塩化カリウム、塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)が入った容器1から送液ポンプ2で流路を通液状態にする。

【0085】(1) 核酸を含有する液体に、1組のプライマー、デオキシリボヌクレオシド三リン酸を添加し試

料とする。

【0086】(2) 試料注入口3から(1)を入れる。

【0087】(3) 高温加熱部4(95°C)で核酸は1本鎖になる。

【0088】(4) 低温加熱部5(55°C)で1本鎖核酸にプライマーがアニーリングする。

【0089】(5) 中温加熱部6(72°C)内に設置されたDNAポリメラーゼを固定化したリアクター7内で1本鎖核酸は伸長し、かつピロリン酸が遊離する。

【0090】(6) 酵素反応部8(37°C)内に設置されたヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ並びにキサンチンデヒドロゲナーゼ／オキシダーゼを固定化したリアクター9内で色素(ホルマザン)が生成する。

【0091】(7) 色素量(ホルマザン量)を可視光吸収検出器10で検出する。

【0092】(8) データはパソコン11に表示かつ蓄積される。

【0093】(1)から(8)を1~40回繰り返したのち、試料は容器12に回収される。

【0094】

【発明の効果】詳述したように、本発明により、有害な試薬を用いることなく、使用する試薬も安価で高精度にピロリン酸を定量することが可能となった。更に、本発明のピロリン酸定量法を利用して、特定核酸の有無を判別できることを見出した。また、固定化酵素を用いた試料一環流方式を用いた核酸定量方法および装置を用いることにより、核酸の非特異的増幅を抑制することができ、かつ反応副生成物であるピロリン酸の蓄積や酵素の失活を抑制することを見出した。従って、従来のPCRの欠点を克服した新しい核酸増幅方法の初期錆型核酸の定量方法およびそのための装置が、本発明により提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のピロリン酸定量方法を用いて得られたピロリン酸濃度と吸光度との関係を示す図。

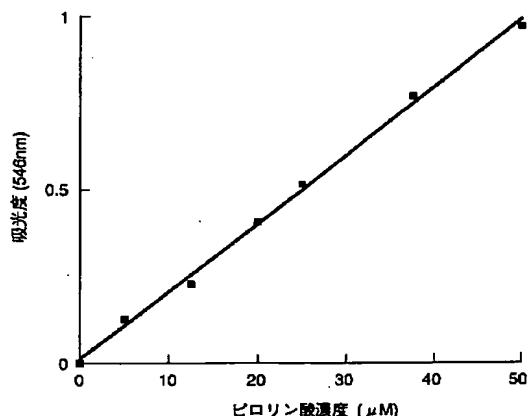
【図2】 本発明の核酸定量方法を用いて得られたサイクル数と吸光度の関係を示す図。

【図3】 本発明の核酸定量装置の一形態を示す模式図。

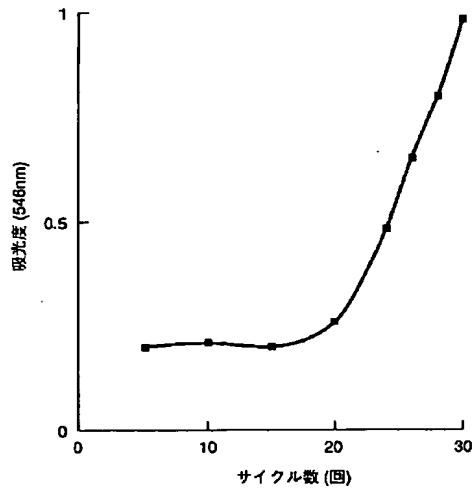
【符号の説明】

1, 12…容器、2…送液ポンプ、3…試料注入口、4…高温加熱部、5…低温加熱部、6…中温加熱部、7, 9…リアクター、8…酵素反応部、10…可視光吸収検出器、11…パソコン、12…分取容器

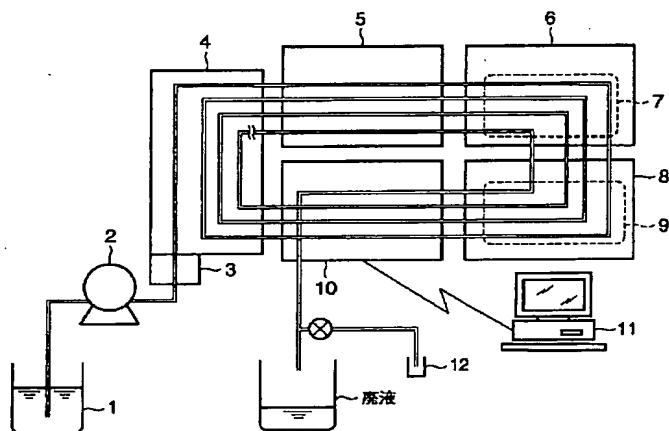
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB16 CC03 FA12  
 HA10  
 4B063 QA01 QQ41 QQ89 QR03 QR04  
 QR07 QR08 QR18 QR19 QR32  
 QR42 QR49 QR50 QR55 QR62  
 QR66 QR82 QS25 QS28 QS32  
 QS36 QX01 QX02

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)